*На правах рукописи*

**Расстригина Ирина Михайловна**

**МОРФОГЕНЕЗ ЦИТОТРОФОБЛАСТИЧЕСКОЙ ИНВАЗИИ В ТЕЧЕНИЕ НЕОСЛОЖНЁННОЙ И ОСЛОЖНЁННОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

Специальность 14.03.02 – патологическая анатомия

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**МОСКВА - 2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «НИИ морфологии человека» Российской академии медицинских наук

**Научный руководитель**:

Заслуженный деятель науки РФ,

доктор медицинских наук, профессор,

**Милованов Андрей Петрович**

**Официальные оппоненты:**

Заведующий кафедрой патологической анатомии,

 цитологии и молекулярной патологии ФГБОУ ДПО

Институт повышения квалификации ФМБА России,

доктор медицинских наук

**Забозлаев Федор Георгиевич**

Руководитель патологоанатомического отделения

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологииим. В.И.Кулакова» МЗРФ

доктор медицинских наук, профессор

**Щёголев Александр Иванович**

**Ведущее учреждение:**

ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет

им. Н.И.Пирогова

**Защита диссертации состоится** « 26 » февраля 2015 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 при ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН по адресу 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3. и на сайте www.<morfolhum@mail.ru>

Автореферат разослан « » 2014г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

**Л.П.Михайлова**

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность проблемы**

Плацента – важнейший орган, играющий значительную роль во внутриутробном развитии человека и во многом предопределяющий его дальнейшую судьбу. Вместе с тем, многие детали функциональной активности плаценты, особенности её строения и влияния на организм матери и плода до сих пор не ясны. Ключевой механизм плацентации –цитотрофобластичестая инвазия (ЦТИ) в стенку матки человека - изучен недостаточно.

ЦТИ представляет собой процесс миграции клеток цитотрофобласта из плаценты в эндометрий и миометрий, где они выборочно внедряются в артерии матки и модифицируют их в расширенные сосудистые каналы, приносящие возрастающий объем материнской крови к плаценте. Благодаря этому устанавливается маточно-плацентарное кровообращение, от которого зависят рост эмбриона и плода, то есть успешное завершение беременности или ее потеря на разных этапах развития**.**

ЦТИ условно подразделяется на волны: начальная (в период имплантации); первая (5-8 нед. после оплодотворения - п.о.); вторая (16-18 нед. постменструального срока (п.м). Первая волна цитотрофобластической инвазии, которая проходит в I триместре беременности, изучена достаточно подробно(Pijnenborg R.et al.,1980; MeekinsJ.W., 1994; Милованов А.П. и др., 1999, 2010). Описаны молекулярные механизмы регуляции, клеточные источники вневорсинчатого цитотрофобласта из оснований ворсин, непосредственно примыкающих к эндометрию (якорные ворсины - ЯВ). Обозначены три типа клеток, осуществляющих инвазивный процесс: 1) интерстициальный цитотрофобласт (ИЦТ); 2) многоядерные гигантские клетки (МГК); 3)эндоваскулярный цитотрофобласт (ЭВТ).

В последние годы установлено (Кириченко А.К., 2005; Милованов А.П. и др., 2009), что ЦТИ продолжается после 18 недели гестации (п.м.). Наблюдается пик её активности в конце II триместра, который длится до 27-28 нед. ИЦТ распространяется из центральной зоны МПО в периферические её отделы и нижнюю треть миометрия, что приводит к прогрессирующему расширению просветов радиальных артерий матки. Однако, морфологических исследований ЦТИ во II триместре физиологической беременности очень мало, что связано с трудностью сбора необходимого материала (Robson S.C. et al.,2001). Отдельные авторы (Salafia C.М. et al., 2005) использовали с этой целью базальную пластину родившейся плаценты с морфометрией эндометриальных сегментов маточноплацентарных артерий. Но подобный материал не подходит для изучения ЦТИ в пределах миометрия. Возникают вопросы, из каких источников формируется значительное количество ИЦТ во II триместре беременности и за счет каких механизмов эти клетки глубоко проникают в миометрий?

Обширное семейство разрушающих матрикс цинкзависимых металлопротеиназ (metalloproteinases- MMPs) играет важную роль во многих физиологических процессах, таких как морфогенез,васкуло- и ангиогенез, склероз и, наконец, опухолевый рост (Weissetal., 2007) Любая доброкачественная и, тем более, злокачественная опухоль является мощным стимулом для возникновения каскада MMPs, который способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток через деградированный матрикс соседних тканей (Пальцев М.А.,2004)**.** Менее известны данные о роли металлопротеиназного каскада в процессе цитотрофобластической инвазии на различных этапах физиологической и осложненной беременности. Имеются данные о значении металлопротеиназ 2 и 9 типов (MMP-2 и -9) в процессе имплантации бластоцисты в эндометрий матки у обезьян  **(**Wang G.L. et al., 1993) и человека (Seval Y. et al., 2004) в раннем развитии плаценты и цитотрофобластической инвазии в I и II триместрах беременности (Hamid J. Ab. et al., 2012)**,** а также в плодных оболочках (Tuuli M.G. et al., 2011)**.** В условиях патологии беременности роль MMPs рассматривается в основном у женщин с преэклампсией и при синдроме привычного невынашивания (Anumba D.O. et al., 2010)**.** Следовательно, данные о ЦТИ на разных этапах неосложненной беременности и при преэклампсии фрагментарны, отсутствуют сведения об источниках инвазии во II триместре беременности, о продукции металлопротеиназ различными типами инвазивных клеток на разных сроках гестации.

**Цель исследования:** морфометрическая оценка различных типов инвазирующего цитотрофобласта, их клеточных источников и продукции металлопротеиназ 2 и 9 типов в течение неосложнённой беременности и при преэклампсии.

**Задачи исследования:**

1. Найти источники цитотрофобластической инвазии в середине беременности.
2. Охарактеризовать количество и размеры интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток в течение неосложненной беременности в стандартной площади маточноплацентарной области.
3. Оценить активность синтеза металлопротеиназ -2 и -9 в трех типахклеток, осуществляющих процесс цитотрофобластической инвазии на разных сроках неосложненной беременности.
4. Определить количество и размеры интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток у женщин, страдавших преэклампсией.
5. Охарактеризовать функциональную активностьметаллопротеиназ - 2 и -9 в трех типахклеток, осуществляющих процесс цитотрофобластической инвазии при преэклампсии.

**Научная новизна**

Впервые выявлена взаимосвязь трех типов инвазирующих клеток в течение неосложненной беременности. В I триместре регистрируется максимальное количество интерстициального цитотрофобласта в стандартной площади среза. Для него характерна умеренная иммуноэкспрессия ММР-2. Эндоваскулярный цитотрофобласт обнаруживается в просветах спиральных артерий эндометрия с высокой иммуноэкспрессией MMP-2. BoII триместре источниками продолжения цитотрофобластической инвазии становятся новые генерации якорных ворсин. С увеличением площади их контакта с эндометрием, пролиферацией ворсинчатого цитотрофобласта осуществляется глубокое проникновение всех инвазивных клеток в сторону радиальных артерий. Встречное взаимодействие интерстициального и эндоваскулярного цитотрофобласта приводит к полному лизису эластических и мышечных компонентов и значительному расширению просвета радиальных артерий. Пик иммуноэкспрессии ММРs приходится на II триместр: возрастает экспрессия MMP-9 в интерстициальномцитотрофобласте и многоядерных гигантских клетках, при максимальном её уровне в эндоваскулярном компоненте. В III триместре регистрируется спад цитотрофобластической инвазии при одновременном увеличении количества и размеров многоядерных гигантских клеток.

 У женщин с преэклампсией цитотрофобластическая инвазия редуцируется за счет эндоваскулярного цитотрофобласта, уменьшения количества и размеров интерстициального циторофобласта и многоядерных гигантских клеток с достоверным снижением в них иммуноэкспрессии металлопротеиназ.

**Научно-практическая значимость**

Количественная оценка трех типов инвазивных клеток с пиками их плотности распределения и металлопротеиназной активности на 9-12 и 18-24 нед. гестации важна в акушерской практике. Первое снижение цитотрофобластической инвазии является одним из основных патогенетических механизмов неразвивающейся беременности. Недостаточность второго пика объясняет начало формирования симптомокомплекса преэклампсии и позволяет уточнить патоморфологические признаки этого тяжелого осложнения в III триместре при изучении биопсий плацентарного ложа и ампутированных маток.

**Апробация работы**

Основные материалы и положения доложены: на Научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2012), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014).

**Внедрение**

Результаты диссертации внедрены в лекционный курс и практические занятия тематических циклов по практической плацентологии на кафедре патологической анатомии, цитологии и молекулярной патологии ФГБОУ ДПО Института повышения квалификации ФМБА России.

**Публикации материалов исследования**

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 141 странице текста, содержит 32 рисунка и 18 таблиц; состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов. Список литературы включает 164 источника, 24 из них – отечественные и 140 – зарубежные.

**СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на операционном материале, полученном после медицинских абортов и гистерэктомий (фрагменты плацент и плацентарного ложа), а также биоптаты, взятые во время проведения кесарева сечения. В целом изучен материал от 82 женщин. Характеристика материала представлена в таблице 1.

**Методы морфологического исследования**

**Световая микроскопия.** Материал фиксирован в 10% растворе формалина, забуференного до нейтрального рН. Из каждого случая отобрано не менее 6 фрагментов, которые проведеныпо стандартной схеме и залиты в парафин. Из блоков делали по 5 серийных срезов. Препараты окрашены гематоксилином и эозином для предварительного обзора (микроскоп LeicaDM2500) на предмет наличия МПО и дальнейшего изучения инвазирующих элементов.

**Иммуногистохимия инвазивных клеток.** После депарафинирования серийные срезы подвергались иммуногистохимическому исследованию в соответствии со стандартными протоколами. Иммунореактивность первичных антител обнаруживали с помощью вторичных антител, коньюгированных с пероксидазной системой. Использовали антитела для выявления **цитокератина 8 типа** (цитокератин-8, фирма Novocastra, клон TS1) + (система детекции Thermo Scientific Ultravision Detection System Anti-Olyvalent, HRP/DAB). С помощью данного маркера визуализировались три инвазивных элемента: 1) ИЦТ– отдельные клетки округлой или вытянутой формы среди желез, децидуальной оболочки и прилежащих пучках миоцитов**.** 2)МГК– клетки имеют более трех ядер с общим ободком иммуноэкспрессии цитокератина.3) ЭВТ – встроенные в эндотелий сосуда клетки, экспрессирующие цитокератин.

**Характеристика изученного материала. Таблица 1.**

|  |
| --- |
| Неосложненная беременность |
| Группы | Срок | Коли-чествослуча-ев | Медабортыпо желанию здоровых пациенток |  Гистерэктомии (показания) | Биопсии плацентарного ложа, взятые во время кесарева сечения |
| I | 7-8 нед. (п.о.) | 10 | 10 соскобов  |  |  |
| II | 9-12 нед.(п.о.) | 15 (3+12) | 3 соскоба  | 1. маток:

1 - разрыв матки после криминального аборта1. - шеечная беременность
	1. – миомы вне маточноплацентарной области
2. - ранний разрыв матки по рубцу
3. - кровотечение после выскабливания по поводу замершей беременности
 |  |
| III | 18-28нед.(п.м.) | 30 (25+5) | 25 соскобов (поздних абортов по медицинс-ким и социальным пока- заниям) | 5 маток:1. миома, послеоперационное кровотечение
2. стерилизация с удалением матки при шизофрении
	1. разрыв матки по рубцу
 |  |
| IV | 31-40 нед.(п.м.) | 12 (5+7) | - | 1. маток:

1- разрыв матки по рубцу2 - крупные миомы3-5 послеродовое кровотечение | 7 биоптатов:1-3- рубeц на матке4-6 – узкийтаз7 - тазовое предлежание |
| Преэклампсия |
| Группа | Срок | Коли-чество случаев | Медаборты | Гистерэктомии | Биоптаты плацентарного ложа |
| V | 28-33 нед.(п.м.) | 11 |  |  | ранняя преэклампсия |
| IV | 34-38 нед.(п.м.) | 4 |  |  | поздняя преэклампсия |
|  |  |  |  |  |  |

На оставшихся серийных срезах использовали готовые к применению антитела для выявления **металлопротеиназ:** 1) ММР-9 (фирма Novocastra, клон 17B11; 2) ММР-9, фирма Novocastra, клон 15W2. Во всех случаях использована единая система детекции (Thermo Scientific Ultravision Detection System Anti-Polyvalent). С помощью данных маркеров исследованы ИЦТ, МГК и ЭВТ. На качественном уровне оценивали интенсивность экспрессии этих клеток при увеличении 200. Для ММР-2 за негативный (0 баллов) был принят уровень окраски окружающих децидуальных клеток. Различали три уровня положительной окраски клеток: 1 балл – слабая; 2 балла – средняя; 3 балла – максимальная. Для ММР-9 уровень окраски окружающих децидуальных клеток был принят за 1 балл, так как из литературы известно (XuP.**,** 2002), что эти клетки слабо положительны по этому маркеру. Соответственно, 0 баллов – негативная окраска, 2 балла – средняя интенсивность окраски, 3 балла – максимальная интенсивность окраски. Из каждого случая нами было оценено по 10 клеток каждого типа.

**Гистометрия**. Инвазивные клетки визуализированы с помощью маркера цитокератин-8. В случаях неосложненной беременности определено количество ИЦТ и МГК в 70 стандартных полях зрения (785000 μм2) при увеличении 200. Для определения размеров инвазивных клеток вычисленацена деления линейки в μм при увеличении 200, а затем измерялся поперечный размер каждой клетки в плоскости среза, проходящей перпендикулярно через ядро. Было использовано большее количество полей зрения (108), измеренопо пять клеток МГК и ИЦТ (соответственно всего 1080клеток). После поздних медицинских абортов в промежутке от 18 до 28 недель с помощью иммуногистохимического маркера цитокератин-8 выявлялись ЯВ, которые непосредственно связаны с эндометрием матки (всего 192 ворсины). По плотности распределения цитотрофобласта (ЦТ) выявляли три разновидности ЯВ: 1) максимальная активность цитотрофобласта с выявлением у базального слоя двух-трех рядов этих клеток (Max);

2) средняя активность при отсутствии рядов с распространением в дистальные отделы эндометрия(Med).3) eдиничный цитотрофобласт (Min).

**Статистические методы** Обработка результатов проводилась с применением программы «STATISTICA-6». Определяли параметры распределения признаков: среднее арифметическое (М), ошибку среднего арифметического(m), стандартное отклонение (δ), медиану (Ме). Сравнивали только близкие по срокам гестации группы (Iи II) с использованием t-критерия Стъюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни.

**Результаты исследования**

***Источники ЦТИ во II триместре неосложненной беременности***

Гестация 18-20 нед. ЯВ с максимальной шириной плотно расположенного ЦТ составляли в среднем лишь 20,09%, с довольно значительным разбросом значений (табл.2). Дополнительное количество резервного ЦТ отделялось от распластанных оснований якорных ворсин, либо они имели подковообразную форму, что увеличивало площадь их анатомического контакта с эндометрием. Якорных ворсин со средней и минимальной активностью ЦТ было больше.

Гестация 22-24 нед.На первое место вышли ЯВ с максимальной плотностью ЦТ, когда у основания ворсин четко контурировались несколько его слоев с последующим рассеиванием вглубь эндометрия. Их число с высокой достоверностью (p<0,001) превышало аналогичный показатель в предыдущей гестационной группе. ЯВ со средней плотностью ЦТ (табл.2) имели лишь тенденцию к уменьшению числа, в то время как ворсин с минимальной плотностью ЦТ стало достоверно меньше. По широким сечениям и полной гестационной перестройке эндометриальных сегментов маточноплацентарных артерий данные плаценты не отличались от предыдущей группы. Следовательно, в этом гестационном сроке отмечено больше всего потенциальных источников ЦТИ в ЯВ.

**Таблица 2**

**Оценка якорных ворсин в % по интенсивности и глубине рассеивания цитотрофобласта**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Параметры | 18-20 недельN=10  | 22-24 неделиN=10  | 25 -28 недельN=10  |
| Max(максимальная ширина)Средний % по группе | М=20,09(14,29-25,0) | M=41,12(35,71-45,45) | М=3,88(0-7,69) |
| Р<0,01 \* р<0,001\* |
| Med(средняя ширина)Средний % по группе | М= 31,89(31,90-47,62) | М=24,35(14,29-33,33) | М=30,60(15,38-44,44) |
|  Р>0,05 р>0,05 |
| Min(минимальнаяширина)Средний % по группе | М=29,65(23,81-29,65) | М=14,20(0-20,0) | М=30,30(11,11-42,86) |
| Р<0,05\* р>0,05 |

\* - достоверные различия между гестационными группами (критерий Манна-Уитни).

Гестация 26-28нед. Соотношения активности ЦТ резко изменились (табл.2) за счет достоверного уменьшения числа ЯВ с максимальной активностью и примерно равным числом ЯВ со средней и минимальной активностью. Под основаниями ЯВ со средней активностью уже не было слоев ЦТ, он был равномерно распределен. В ворсинах с минимальной активностью ЦТ отмечен непосредственный контакт основаниями ЯВ со слоем фибриноида и лишь единичным инвазирующим ЦТ.

В целом, в конце II триместра отмечается явное уменьшение числа и снижение интенсивности инвазии ЦТ вглубь эндометрия и миометрия, хотя встречались отдельные ЯВ с высокой активностью инвазивных клеток набольшом протяжении параллельно идущей ворсины.

***Количество и размеры инвазивных клеток при неосложненной беременности***

Плотность распределения двух типов инвазивных клеток в сроке гестации 7-8 недель п.о. высокая, с явным преобладанием ИЦТ (табл. 3).

**Таблица 3.**

**Абсолютное количество инвазивных клеток в стандартном поле зрения**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Срок гестации(группы) | МГК | ИЦT |
| 7-8 недель(I) | 14,80(8,88-20,71) | 248,80(184,76-312,84) |
| 9-12 недель(II) | 13,21(10,62-15,80) | 273,11(245,30-300,91) |
| 18-25 недель(III) | 24,64 (19,23-30,06) | 192,36 (122,02-262,70) |
| 31-40 недель(IV) | 43,65 (29,66-57,63) | 48,18 (16,64-79,72) |

Значимых различий между гестационными группами Iи IIне выявлено (p>0,05).

Форма и величина ИЦТ зависят от плоскости среза, проходящего через ядро или вдоль клетки. Величина поперечного диаметра этих клеток в ядерной зоне менее вариабельна и позволяет сравнивать оценить их истинные размеры. Диаметр ИЦТ в самом раннем из исследованных сроков минимален (табл. 4).

**Таблица 4.**

**Размер поперечного диаметра инвазивных клеток (μм)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Срок гестации(группы) | МГК | ИЦT |
| 7-8 недель(I) | 23,89 (23,10-24,68) | 15,74 (15,02-16,46) |
| 9-12 недель(II) | 29,65\* \*\* (28,79-30,52) | 21,95 \* \*\*(21,40-22,51) |
| 18-25 недель(III) | 39,89 (37,97-41,81) | 24,63(23,76-25,50) |
| 31-40 недель(IV) | 45,47 (44,02-46,92) | 25,29(24,42 – 26,16) |

Различия между группами I и II достоверны (t-критерий Стъюдента\*, (критерий Манна-Уитни\*\*). (p<0,05).

Важная информация получена с помощью оценки распределения ИЦТ и МГК во IIтриместре (Табл. 3). В период с 3 по 6 месяцы гестации количество ИЦТ уменьшилось (до 70%) в стандартной площади среза МПО при относительно небольшом увеличении размеров (112,2%).

Более демонстративной оказалась динамика изменения количества и диаметров МГК. За истекший гестационный отрезок плотность распределения этих клеток возросла до 186,5% при одновременном увеличении их диаметра. III триместр беременности характеризуется уменьшением количества ИЦTв стандартной площади МПО, увеличением количества МГК (табл. 3) и их максимальными размерами, в широких радиальных артериях встречаются единичные ЭВТ. ИЦТ сохраняется в небольшом количестве до доношенного срока, преимущественно в зоне адвентиции или непосредственно в стенке радиальных артерий. При анализе во всех биоптатах плацентарного ложа и удаленных маток замечено, что ЭВТ уменьшается в количестве и особенно в зоне эндотелиальной выстилки артерий, где удается определить лишь единичные клетки.

***Количество и размеры инвазивных клеток при беременности, осложненной преэклампсией***

Материал биоптатов плацентарного ложа маток при ранней форме преэклампсии (28-33 недели гестации) характеризуется отсутствием признаков гестационной перестройки радиальных артерий. Встречаются артерии, сохраняющиев стенке эластический и мышечный компоненты, с узкими просветами, в отдалении от них видны инвазивные клетки, чаще всего это ИЦТ, который распределен неравномерно, в виде отдельных скоплений. Иммуноэкспрессия маркера цитокератин-8 в этих клетках представлена в виде мелкогранулярного распределения вокруг ядер, то есть без плотного венчика. МГК встречаются в большом количестве, но лишь в отдельных из них визуализирована иммуноэкспрессия маркера, большинство этих клеток - иммунонегативны. Ни в одной из 11 биопсий не было видно признаков инвазии ЭВТ.

В группе биоптатов плацентарного ложа женщин с преэклампсией, возникшей после34-38 недель гестации, замечено, что в радиальных артериях при наличии неполной их гестационной перестройки выявляется начальная стадия проникновения ЭВТ в слой эндотелия. Однако не наблюдалось полного замещения эндотелиальной выстилки артерий и, как правило, отмечалось слабое, неглубокое проникновение ИЦТ со стороны адвентиции. Было отмечено небольшое количество радиальных артерий без признаков гестационной перестройки.

При преэклампсии (34-38 нед.) количество клеток в единице площади МПО снижено: ИЦТ составил лишь 28,93%, МГК - 73,04% от нормы (табл. 5). Процесс постепенного изменения величины клеток также нарушен. Размеры клеток в доношенном сроке при преэклампсии значительно меньше (клетки ИЦТ 37,56%, а МГК 59,01% (табл. 6).

**Таблица 5**

**Абсолютное количество инвазивных клеток при беременности, осложненной преэклампсией.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| СРОК ГЕСТАЦИИ(группы) | МГК | ИЦT |
| 28-33 недели (V) | 32,65 клеток | 31,42 клетки |
| 34-38недель (VI) | 31,88 клетки | 13,94 клетки |
|  | p<0,05\*\* | p<0,05\*\* |

\*\*Различия достоверны (критерий Манна-Уитни.)

**Таблица 6**

**Размеры диаметров поперечных срезов инвазивных клеток при преэклампсии в (μм)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| СРОК ГЕСТАЦИИ(группы) | МГК | ИЦТ |
| 28-33недели (V) | 37,50 (норма=44,00) | 13,64 (норма=23,67) |
| 34-38 недель (V) | 26,83 (норма=46,27) | 9,50 (норма=24,41) |
|  | p<0,05\*\* | p<0,05\* \*\* |

\*Различия достоверны (t-критерий Стъюдента.\*),(критерий Манна-Уитни\*\*).

***Изучение экспрессии ММР в различные сроки неосложненной беременности***

В I триместре неосложненной беременности максимальной протеолитической активностью обладает ЭВТ как в отношении MMP-2, так и MMP-9. (Табл. 7,8). Во II триместре в сравнении с I триместром на протяжении 18-28 недель происходит смена активности экспрессии: иммуноэкспрессия ММР-2 во всех типах инвазивных клеток уменьшается, а иммуноэкспрессия MMP-9, наоборот, нарастает с преобладанием в ЭВТ. Сохраняется высокая инвазивная и протеолитическая активность ЭВТ (экспрессия MMP-2 и особенно MMP-9).

**Таблица 7**

**Интенсивность иммуноэкспрессии ММР-2**

|  |  |
| --- | --- |
| Срок гестации (группы) | Интенсивность окрашивания (в баллах) в завиcимости от типа клеток |
| ИЦТ | МГК | ЭВТ |
| 7-8 недель(I) | 1,81(1,65-1,98) | 1,42 (1,24-1,61) | 3,0 |
| 9-12 недель(II) | 2,08\*\*(1,95-2,20) | 1,52(1,41-1,64) | 2,93(2,87-2,99) |
| 18-25 недель(III) | 2,04(1,89-2,19) | 1,54(1,39-1,69) | 2,76(2,67-2,86) |
| 31-40 недель(IV) | 0,89 (0,67-1,10) | 0,7 (0,50-0,90) | 2,99 (2,98-3,0) |

Различия достоверны при сравнении групп I и II по методу Манна – Уитни\*\* p<0,05.

**Таблица 8**

**Интенсивность иммуноэкспрессии ММР-9**

|  |  |
| --- | --- |
| Срок гестации(группы) | Интенсивность окрашивания (в баллах) в зависимости от типа клеток |
| ИЦТ | МГК | ЭВТ |
| 7-8 недель(I) | ≈1,0 (минимальная) | ≈1,0 (минимальная) | 2,47(2,34-2,60) |
| 9-12 недель(II) | 1,27\* \*\*(1,19-1,35) | 1,04(1,00-1,07) | 2,68\* \*\*(2,56-2,80) |
| 18-25 недель(III) | 2,31(2,17-2,45) | 1,94(1,81-2,08) | 2,89(2,82-2.96) |
| 31-40 недель(IV) | 2,11(1,95-2,27) | 2,04(1,86-2,23) | 2,99 (2,98-3,0) |

Различия достоверны при сравнении групп I и II по методу Стъюдента\*  и Манна-Уитни \*\* p<0,05.

***Изучение экспрессии ММР у женщин, страдавших преэклампсией***

Данные по степени экспрессии ММР 2 и 9 в элементах ЦТИ у женщин, беременность которых была осложнена преэклампсией, отражены в таблице 9 и 10 (Табл. 9,10).

**Таблица 9**

**Оценка интенсивности экспрессии ММР-2 в компонентах ЦТИ при преэклампсии**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №группы | срок | ИЦТ | МГК | ЭВТ |
| V | 28-33нед. | 1,48 (1,34-1,62) | 0,84 (0,72-0,95) | - |
| VI | 34-38 нед. | 1,20(1,09-1,31) | 1,02\*(0,86-1,18) | - |

\* Различие достоверно при сравнении групп Vи VI (критерий Манна-Уитни) p<0,05.

**Таблица 10**

**Оценка интенсивности экспрессии ММР-9 в компонентах ЦТИ при преэклампсии**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № группы | срок | ИЦТ | МГК | ЭВТ |
| V | 28-33нед. | 1,27(1,18-1,37) | 1,40(1,27-1,54) | - |
| VI | 34-38 нед. | 1,02\*(0,90-1,14) | 1,06\*(0,87-1,25) | - |

\* Различие достоверно при сравнении групп Vи VI(критерий Манна-Уитни) p<0,05.

 Интенсивность экспрессии протеолитических ферментов по сравнению с нормой низкая, как для ММР- 2, так и для ММР-9 типа. К моменту родов она держится на том же уровне.Следует отметить, что чем тяжелее протекает преэклампсия, тем раньше женщины требуют оперативного родоразрешения, поэтому недостаточная перестройка маточноплацентарных артерий более заметна в группе 28-33 недели. Важен тот факт (табл. 10), что размеры компонентов ЦТИ у женщин, страдающих преэклампсией, по сравнению с неосложненной беременностью, уменьшены. В случаях родоразрешения на 34-38 нед. компенсаторные возможности истощены и размеры инвазивных клеток оказываются меньше, чем в предыдущей группе. Оценка ЭВТ в этом случае затруднена, так как интенсивность инвазии патологически снижена и в большинстве артерий миометрия ЭВТ отсутствует.

**Обсуждение**

Анализируя полученные данные по неосложненной беременности, следует подчеркнуть, что выявленные пики активности ЦТ из оснований ЯВ на 18-20 и, особенно, 22-24-ой нед. (п.м.) соответствуют максимуму интерстициальной и внутрисосудистой инвазии в радиальные артерии матки с перестройкой их стенок и последовательным расширением просветов (Кириченко А.К., 2005). В этих случаях интерстициальный цитотрофобласт обнаруживался не только в эндометрии, но и в прилежащем миометрии. Многие радиальные артерии подверглись полной гестационной перестройке. Впервые показано, что клеточным источником инвазии в миометрий являются новые генерации ЯВ с максимальной продукцией интерстициального цитотрофобласта, который затем трансформируется в ЭВТ и МГК. Этот факт объясняет последовательную гестационную перестройку радиальных артерий и увеличивающийся приток материнской крови в межворсинчатое пространство плаценты и, соответственно, обеспечивает интенсивный рост массы плода во II триместре. В конце II триместра количество ЯВ с максимальной активностью ЦТ в 7 раз уменьшается при сохранении ворсин со средней активностью ЦТ. Иными словами, резко уменьшается количество источников инвазирующего ЦТ для проникновения его глубоко в миометрий, в зону радиальных артерий. В III триместре гестации ЯВ подвергаются деструкции с исчезновением эпителиального покрова и склерозом стромы и перестают быть клеточным источником инвазии. Одновременно происходит дальнейшее усложнение ворсинчатого дерева с преобладанием самых мелких терминальных ворсин с формированием синцитиокапиллярных мембран – самых тонких фрагментов плацентарного барьера. За счет этого плацента становится более эффективным диффузионным органом и обеспечивает прирост массы плода в III триместре, когда инвазионные процессы и вовлечение в гестационную перестройку новых радиальных артерий замедляются.

Таким образом, в I триместре беременности ИЦТ является самым многочисленным элементом ЦТИ, определяющим её ход в пределах децидуальной оболочки. Наибольшее его количество наблюдается на 9-12 неделе гестации, то есть в момент перехода на гемохориальный тип обмена «плацента-плод» (Jauniaux, 2003). Если обратиться к рисунку 1, можно заметить, что на 18 неделю гестации II триместра приходится пик инвазии. Мы наблюдали интенсивную инвазию без спадов с 18 по 24 неделю гестации (п.м.) В размерах ИЦТ увеличивается незначительно, но по-прежнему происходит увеличение размеров и количества ядер в МГК. Протеолитический фермент ММР-2 по-прежнему экспрессируется во всех клетках: лучше всего - в ЭВТ, слабее в ИЦТ, еще слабее – в МГК. Последовательно увеличивается экспрессия ММР-9. Важно отметитьоднонаправленное действие ЭВТ и ИЦТ.



Количество клеток в стандартном поле зрения

Недели

Стрелками (↓) показаны пики активности инвазии по наблюдениям R.Pijnenborg (1980)

Рис. 1. Количество ИЦТ и МГК при неосложненной беременности

В какой же степени полученные морфометрические данные иммуновизуализированных инвазивных клеток можно соотнести с ранее полученными материалами? Среди них в большей степени подходит фундаментальное исследование Pijnenborg R. et al (1981г) на материале 49 ампутированных маток в сроке от 8-18 недель п.м. B условно выделенных ими волнах цитотрофобластической инвазии первый пик приходился на 6-8 недели гестации, то есть на 4-6 нед. п.о. Если учитывать, что первые наши случаи относились к 7-8нед. п.о.,то в сопоставимом отрезке максимальное количество интерстициального цитотрофобласта в стандартном поле маточноплацентарной области совпадает с данными Pijnenborg R. (1981) . Но упомянутый им первый пик инвазии нужно продолжить до конца I триместра, поскольку максимальная плотность ИЦТ отмечена на 9-12 нед. (п.о.). В работах Pijnenborg R.(1980, 1981), а также Кириченко А.К. (2010) не анализировались отдельно многоядерные гигантские клетки. По нашим данным, в рассматриваемом после оплодотворения сроке их количество минимальное за весь период гестации (рис. 1), с постепенным ростом к концу беременности. В целом, представленные данные совпадают с максимумом цитотрофобластической инвазии по оценке МиловановаА.П., Кириченко А.К. (2010г.), использовавших бальную шкалу.

Для первой волны ЦТИ характерны начальная, а затем полная гестационная перестройка спиральных артерий за счет максимального количества ИЦТ при достоверном приросте его размеров и умеренной иммуноэкспрессии MMP-2 и слабой – MMP-9. Таким образом, в доношенной плаценте в норме во всех инвазивных элементах нарастает экспрессия ММР- 9 типа, возможно это связано с подготовкой матки к родам.

Степень зрелости и выраженности инвазии при беременности, осложненной преэклампсией, не соответствуют сроку гестации. Наблюдается т.н. «мозаичность» общей картины. Подтверждается тот факт, что преэклампсия – серьезное, часто смертельное для матери и плода осложнение беременности. Инвазия в этих случаях извращена, она недостаточно интенсивна и эффективна. В результате не происходит перестройки маточноплацентарных артерий в достаточном объеме. При данной акушерской патологии лишь единичные клетки ЦТ могут встроиться в стенку сосуда, изменить её ригидность они не в состоянии и объем крови, поступающей к плоду во время II и, особенно, III триместров, существенно не увеличивается.

**ВЫВОДЫ**

1. Цитотрофобластическая инвазия – важнейший инициирующий и связующий процесс в репродуктивной системе «мать-плацента-плод»; для её реализации важны оптимальные соотношения основных клеточных компонентов, их металлопротеиназной активности в процессе неосложненной беременности.
2. В I триместре определяющим инвазивным типом клеток является интерстициальный цитотрофобласт с максимальным его количеством в стандартном поле зрения маточноплацентарной области на 9-12 неделе (п.о.) и последующим уменьшением этого показателя на 28,8% - во II триместре, а затем - на 75% к доношенному сроку. Одновременно отмечено достоверное увеличение диаметров его срезов через ядерную зону в конце I триместра.
3. Количество многоядерных гигантских клеток минимально в I триместре (в 20 раз меньше интерстициального цитотрофобласта). Их число и размеры постепенно возрастают во II и III триместрах и они становятся значимым инвазивным элементом к доношенному сроку.
4. Основным источником цитотрофобластической инвазии во II триместре служит новая генерация якорных ворсин с пластами цитотрофобласта в их основаниях. На 18-20 неделе (п.м.) отмечено увеличение зоны контакта с децидуальной оболочкой матки до максимума на 22-24 нед. и дальнейшим ослаблением этого процесса в III триместре с атрофией эпителия и склерозом стромы ворсин.
5. Металлопротеиназа 2 типа является существенным протеолитическим ферментом инвазии. Она непрерывно экспрессируется во всех инвазивных клетках, начиная с I триместра и до 25 недели гестации, наиболее интенсивно в эндоваскулярном, слабее - в интерстициальном цитотрофобласте. Минимальная иммуноэкспрессия отмечена в многоядерных гигантских клетках. К концу беременности во всех инвазивных клетках интенсивность экспрессии ММР-2 снижается.
6. Металлопротеиназа 9 типа экспрессируется на высоком уровне во всех сроках беременности только в эндоваскулярном цитотрофобласте. Остальные инвазивные элементы до 18 нед. малоактивны и только в III триместре экспрессия этого протеолитического белка в интерстициальном цитотрофобласте и многоядерных гигантских клетках возрастает.
7. У женщин, страдаюших преэклампсией, интерстициальный цитотрофобласт распределен в маточноплацентарной области неравномерно, суммарное количество его значительно ниже, чем в при неосложненной беременности (28,93%), для многоядерных гигантских клеток (73,04%). Размеры клеток в доношенном сроке при преэклампсии значительно меньше (интерстициальный цитотрофобласт 37,56%, а многоядерные гигантские клетки - 59,01%).
8. Экспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов при преэклампсии близка к минимальным значениям как в интерстициальном цитотрофобласте, так и в многоядерных гигантских клетках. В случаях ранней преэклампсии отмечена поверхностная инвазия цитотрофобласта в радиальные артерии миометрия. В случаях поздней преэклампсии наблюдалась недостаточная цитотрофобластическая инвазия.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

***Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций:***

1. Милованов А.П., **Расстригина И.М.,** Фокина Т.В. Якорные ворсины – источники цитотрофобластической инвазии во II триместре физиологической беременности // [Архив патологии](http://elibrary.ru/contents.asp?titleid=7664). 2012; 74(2): 26-28.
2. Милованов А.П., **Расстригина И.М.**, Фокина Т.В. Морфометрическая оценка плотности распределения и диаметра клеток вневорсинчатого цитотрофобласта в течение условно неосложненной беременности. [Архив патологии](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1124464). 2013; 75(3): 18-21.
3. **РасстригинаИ.М.**, МиловановА.П., ФокинаТ.В., КадыровМ.. Интенсивность иммуноэкспрессии 2 и 9 металлопротеиназ в инвазивном цитотрофобласте в отдельных сроках неосложненной беременности и при преэклампсии. [Архив патологии](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1124464). 2014;76[(3](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1124464&selid=19093377)): 24-29.

***Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, продолжающихся изданиях и сборниках:***

1. **Расстригина И.М**., Милованов А.П., Фокина Т.В. Особенности второй волны цитотрофобластической инвазии: регуляция дифференцировки цитотрофобласта, роль эндоваскулярного фенотипа и многоядерных гигантских клеток (обзор литературы). [Клиническая и экспериментальная морфология](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1028849). 2012; [2](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1028849&selid=17919945): 59-64.
2. Милованов А.П., **Расстригина И.М.,** Фокина Т.В. Роль металлопротеиназ типа 2 и 9 при физиологической и осложненной беременности (обзор литературы). [Клиническая и экспериментальная морфология](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1091150). 2012; [4](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1091150&selid=18379023): 70-74.
3. **Расстригина И.М.,** Фокина Т.В. Распределение типов инвазивных клеток цитотрофобласта в динамике неосложненной беременности: Сборник научных трудов Научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии».М: 4Мпресс; 2012: 122-125.
4. Милованов А.П., **Расстригина И.М.**, Фокина Т.В. Многоядерные гигантские клетки – элемент цитотрофобластической инвазии второй половины беременности:Сборник научных трудов Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». М.: MDB; 2014: 173-176.

Соискатель \_\_\_\_\_\_\_И.М.Расстригина